

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 25—27, Januar 1971

Die Bestimmung von Xylit und Sorbit im Blut

Ein Vergleich zwischen gaschromatographischer und enzymatisch-kinetischer Analyse

Von F. D. GAUCHEL, GERLIND WAGNER und K. H. BÄSSLER

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Mainz (Direktor: Prof. Dr. R. K. Zahn)

(Eingegangen am 9. September 1970)

Es wird ein gaschromatographisches Verfahren zur Bestimmung von Xylit und Sorbit in kleinen Blutproben beschrieben. Die Methode wird mit der enzymatisch-kinetischen Bestimmung von Xylit und Sorbit verglichen.

The determination of xylitol and sorbitol in blood. A comparison of gas chromatographic and enzymatic-kinetic methods

A method for the determination of xylitol and sorbitol in small blood samples by gas-liquid chromatography is described. The method is compared with the enzymatic-kinetic analysis of xylitol and sorbitol.

Sorbit und Xylit sind Polyalkohole, die in der Diabetes-therapie und zur parenteralen Ernährung angewandt werden können. Zu ihrer quantitativen Bestimmung im biologischen Material eignen sich vor allem die gaschromatographische und enzymatische Analyse, da beide Methoden keine zusätzliche chromatographische Vorreinigung der Probe erfordern. Die zur Sorbitbestimmung übliche enzymatische Endwertmethode (1) ist für Xylit wegen der ungünstigen Gleichgewichtskonstante nicht empfehlenswert (2). Xylit wird daher enzymatisch-kinetisch bestimmt (3), Sorbit kann, wie nachfolgend gezeigt, ebenfalls nach diesem Verfahren bestimmt werden.

Die von uns ausgearbeitete gaschromatographische Bestimmung erfolgt in Anlehnung an SWEETLEY und Mitarbeiter (4) nach Silylierung der Polyalkohole.

Methodik

Reagenzien

Soweit nicht anders vermerkt, werden Reagenzien der Fa. Merck AG, Darmstadt vom Reinheitsgrad p. a. benutzt. Pyridin, Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorsilan wurden von Pierce Co., Rockford, Ill. USA, die Sorbitdehydrogenase (EC 1.1.1.14) und NAD von Boehringer, Mannheim, bezogen. Xylit stammte von J. Pfrimmer & Co., Erlangen.

Silylierungsreagenz: Hexamethyldisilazan-Trimethylchlorsilan-Pyridin (6:3:1 (v/v)) Phthalsäurediäthylester-Lösung: 2,5 μ l gleich 2,79 mg Ester gelöst in 5,0 ml Pyridin.

Geräte

Gaschromatograph Modell 200 der Fa. Varian. Spektrallinienspektrophotometer Eppendorf. Gefriertrockenanlage Leybold G 01. Olivetti Programm 101. Sämtliche nachfolgend beschriebenen Reaktionen wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Gaschromatographische Analyse

Rattenblut wird mit Trichloressigsäure enteiweißt. Eiweißfällungen mit Methanol-Aceton, Perchlorat oder Zink erwiesen sich als ungünstig wegen Störung der Silylierungsreaktion oder zu großer Verdünnung der Probe. Als innerer Standard dient Phthalsäurediäthylester, andere Substanzen wie Dulcitol, Mannit, Inositol, Pyren oder Terphenyl waren wegen unsymmetrischer oder sich überlagernder Peaks ungeeignet. Als Eichlösung dient

heparinisiertes Rattenblut, dem bekannte Mengen Xylit und Sorbit zugemischt werden.

Arbeitsvorschrift

Zur Eichung werden 0,1 ml Vollblut mit 0,2 ml 10proz. Trichloressigsäure versetzt unter Zusatz von 20 μ l einer wäbr. Polyollösung, die jeweils 10 bis 50 μ g Xylit und Sorbit enthält. Bei unbekannten Proben wird statt der Polyollösung dest. Wasser zugegeben.

Nach Zentrifugation extrahiert man 0,25 ml des Überstandes zur Entfernung der Trichloressigsäure fünfmal mit dem gleichen Volumen Äther (pH-Kontrolle der ätherischen Phase!), kühlt auf -40° und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird nacheinander mit 50 μ l Phthalsäurediäthylester-Lösung und 50 μ l Silylierungsreagenz versetzt und 4 Stdn. unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach werden 1–2 μ l des silylierten Gemisches gaschromatographisch analysiert.

Gaschromatographische Bedingungen

Stahlsäule 160 \times 0,3 cm, 5% SE 30 auf Chromosorb W 60 bis 80 mesh. Probengeber 250 $^{\circ}$, Detektor (FID) 275 $^{\circ}$. 25 ml N_2 /Min. Temperaturprogramm 4 $^{\circ}$ /Min. beginnend bei 145 $^{\circ}$, ab 170 $^{\circ}$ isotherm.

Enzymatische Analyse

Die enzymatisch-kinetische Bestimmung von Xylit nach BÄSSLER (3) kann auch zur Analyse von Sorbit angewandt werden. Im folgenden wird nach der Originalvorschrift (3) vorgegangen, zur Erhöhung der Empfindlichkeit werden lediglich kleinere Endvolumina gewählt; als Eichlösung dient Rattenblut, dem 10 bis 50 μ g Polyalkohol pro Probe zugemischt werden.

Man enteiweißt 0,1 ml Blut mit 0,2 ml 10proz. Perchlorsäure und versetzt 0,2 ml des Überstandes mit 0,2 ml 0,7M K_3PO_4 . Nach Zentrifugation werden 0,3 ml der Probe mit 1,0 ml 0,3M Tris-puffer pH 8,1, 0,6 ml dest. Wasser, 0,1 ml NAD (10 mg/ml) und 0,01 ml Sorbitdehydrogenase (175 U/ml) versetzt. Die Extinktionsänderung bei 366 nm wird laufend registriert und zwischen der 6. und 18. Sek. ausgemessen.

Die Ausgangskonzentration der Polyalkohole wird im Laufe der Analyse um den Faktor 41,5 verdünnt. Bei einer Ausgangskonzentration von 10 μ g pro Probe ergeben sich folgende Konzentrationen im Bestimmungsansatz: Xylit 15,8 μ M, Sorbit 13,2 μ M.

Ergebnis und Diskussion

Gaschromatographische Bestimmung

Abbildung 1 zeigt ein typisches Gaschromatogramm. Die Auswertung erfolgt durch Ausmessung der Peak-

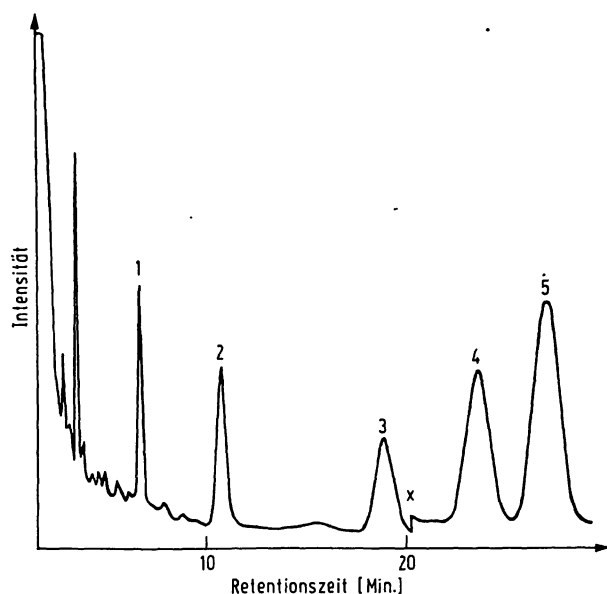


Abb. 1

Gaschromatographische Bestimmung von 10 bis 30 μg Xylit und Sorbit in 0,1 ml Blut. Die nummerierten Peaks entsprechen folgenden Substanzen: 1. Phthalsäurediäthylester als innerer Standard; 2. Xylit; 3. α -D-Glucose; 4. Sorbit; 5. β -D-Glucose. Bei x Erhöhung der Empfindlichkeit um den Faktor 2

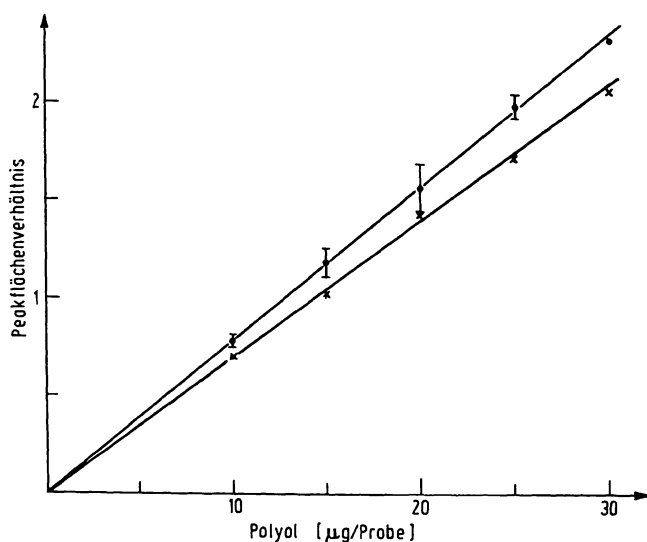


Abb. 2

Eichkurven zur gaschromatographischen Bestimmung von Sorbit und Xylit. Regressionsgeraden aus jeweils 25 Messungen. Für Xylit sind die Standardabweichungen angegeben. Ordinate: Peakflächenverhältnis Polyol/innerer Standard

•—• = Xylit x—x = Sorbit

flächen (Peakfläche = Höhe \times Halbwertsbreite). Wird das Peakflächenverhältnis Polyalkohol/Innerer Standard gegen die Konzentration der Polyalkohole aufgetragen, so ergibt sich für Xylit und Sorbit eine lineare Eichgerade, die durch den Nullpunkt geht. Abbildung 2 zeigt die nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate aus je 25 Messungen ermittelten Regressionsgeraden. (Programm Nr. 201 der Olivetti Programma 101). Jeder Punkt ist der Mittelwert aus 4–7 Messungen, die Standardabweichungen sind in der Abbildung 2 eingetragen, die Variationskoeffizienten der einzelnen Gruppen betragen für Xylit 3,2% bis 7,2%, für Sorbit 5,7% bis 9,5%. Für die beiden höchsten Konzentra-

tionen wurden nur je zwei Messungen durchgeführt. Die Nachweisgrenze der Methode ist mit 10 $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ Blut bei weitem nicht erreicht. Der Zeitbedarf für ein Gaschromatogramm beträgt durchschnittlich 30 Min. Die gute Trennung von Xylit, Sorbit sowie α - und β -Glucose ist aus Abbildung 1 zu ersehen.

Enzymatische Bestimmung

Der Substratumsatz der enzymatischen Oxydation von Xylit und Sorbit beträgt während der ersten 18 Sek. höchstens 8,7% bzw. 5,2% der Ausgangskonzentration. Zur Ermittlung der Anfangsgeschwindigkeit soll üblicherweise die Änderung der Substratkonzentration kleiner sein als 10% der Ausgangskonzentration (5). Meßzeit, Enzymkonzentration und Nachweisgrenze des Verfahrens sind so limitiert.

Die enzymatischen Versuche ergeben keine direkte Proportionalität zwischen der gemessenen Änderung der Extinktion als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit und der gesuchten Substratkonzentration S_0 .

Da sich enzymatische Reaktionen nur hinreichend genau durch eine Reaktion erster Ordnung beschreiben lassen, wenn S_0 kleiner als 10% der Michaelis-Konstanten ist (6), die untersuchten Polyolkonzentrationen in den Bestimmungsansätzen dagegen in der Größenordnung der Michaelis-Konstanten der Sorbitdehydrogenase für diese Substrate (10–30 μM) liegen, kann nur die doppelt reziproke Darstellung des LINEWEAVER-BURK-Diagramms eine Eichgerade ergeben.

Aus Abbildung 3 sind die Ergebnisse zu entnehmen; jeder Punkt ist der Mittelwert aus 6 (Sorbit) oder 7

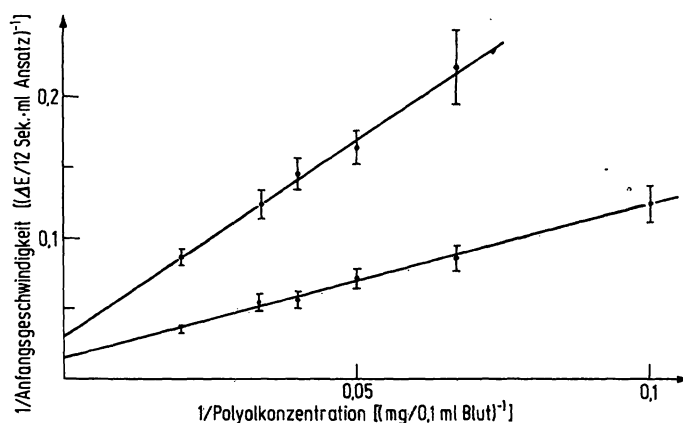


Abb. 3

Eichkurven zur enzymatisch-kinetischen Bestimmung von Xylit und Sorbit. LINEWEAVER-BURK-Diagramm. Ordinate: reziproke Änderung der Anfangsgeschwindigkeit. Abszisse: reziproke Konzentration

Obere Kurve: Sorbit, untere Kurve: Xylit

(Xylit) Messungen. Die Variationskoeffizienten der Analysengruppen schwanken zwischen 9,4% und 17%, sie näherten sich bei zunehmender Einübung des Analysenverfahrens der unteren Grenze. Die Geraden wurden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet, die PEARSON-BRAVAIS'schen Korrelationskoeffizienten betragen 0,961 (Xylit) bzw. 0,953 (Sorbit) (Programm Nr. 201 der Olivetti Programma 101).

Bewertung der Methoden

Eine Bestimmung von Xylit und Sorbit im gleichen Ansatz ist nicht enzymatisch, wohl aber gaschromatographisch möglich. Für Xylit-Konzentrationen kleiner als $10 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ Blut empfiehlt sich die in diesem Konzentrationsbereich präzisere gaschromatographische Bestimmung. Entsprechende Sorbit-Konzentrationen lassen sich mit der enzymatischen Endwertmethode erfassen. Die gaschromatographische Methode erfordert einen wesentlich höheren zeitlichen und experimentellen Aufwand, sie kann nur von einer geübten Fachkraft

durchgeführt werden. Die enzymatische Bestimmung ist schnell, experimentell einfacher und für Reihenuntersuchungen das derzeit einzig mögliche Verfahren. Über Stoffwechselversuche mit der hier beschriebenen gaschromatographischen Methode wird an anderer Stelle berichtet (7).

Herr Prof. Dr. K. BEYERMANN, Institut für anorganische Chemie und Kernchemie der Universität Mainz, hat die vorliegende Arbeit durch wertvolle Ratschläge wesentlich gefördert. Er ermöglichte uns die Benutzung einer gaschromatographischen Ausrüstung (BE 263/4) der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen seines Arbeitskreises.

Literatur

1. WILLIAMS-ASHMAN, H. G., in Methoden der Enzymatischen Analyse, Ed. H.-U. Bergmeyer, Verlag Chemie Weinheim (1962).
2. BÄSSLER, K. H., V. UNBEHAUN und W. PRELLWITZ, Biochem. Z. 336, 35 (1962). — 3. BÄSSLER, K. H., in Methoden der Enzymatischen Analyse, 2. Aufl. (1970), Ed. H.-U. Bergmeyer, Chemie Weinheim im Druck. — 4. SWEETLEY, C. C., R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, J. Amer. chem. Soc. 85, 2497 (1963).
5. FORST, A. A. und R. G. PEARSON, Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen, S 41 Verlag Chemie, Weinheim (1964). — 6. GUIBAULT, G. G., Enzymatic Methods of Analysis, S. 7 Pergamon Press, New York (1970). — 7. WAGNER, G., F. D. GAUCHEL und K. H. BÄSSLER, Medizin u. Ernährung 11, 179 (1970).

Prof. Dr. K. H. Bässler
Physiol.-chem. Inst. der Univ. Mainz
6500 Mainz
Joh.-Joachim-Becher-Weg 13